

# Estudio de las glicoproteínas de la membrana plaquetaria GPIb y GPIIb-IIIa en pacientes urémicos

A. Cases, G. Escolar \*, M. Garrido \*, A. Ordinas \*, J. López Pedret, Ll. Revert y R. Castillo \*  
Servicios de Nefrología y \* Hemoterapia y Hemostasia. Hospital Clínic i Provincial. Barcelona.

## RESUMEN

Utilizando anticuerpos monoclonales específicos se ha estudiado la distribución y la densidad de las glicoproteínas de la membrana plaquetaria con función de receptor GPIb y GPIIb-IIIa en un grupo de cinco pacientes hemodializados y con trombopatía urémica. Las muestras de plasma rico en plaquetas se fijaron previamente en paraformaldehído. Las glicoproteínas fueron detectadas mediante microscopia electrónica en la superficie plaquetaria utilizando un segundo anticuerpo marcado con oro coloidal. El estudio morfométrico demostró que la densidad de partículas de oro asociadas a la superficie de la membrana de las plaquetas normales era de  $1,9 \pm 0,15$  partículas/ $\mu\text{m}$  para la GPIb y de  $3,3 \pm 0,44$  partículas/ $\mu\text{m}$  para la GPIIb-IIIa. En los pacientes urémicos la densidad era de  $1,86 \pm 0,08$  partículas/ $\mu\text{m}$  y de  $2,95 \pm 0,33$  partículas/ $\mu\text{m}$ , respectivamente, no apreciándose diferencias estadísticamente significativas. Estos resultados sugieren que la alteración del funcionalismo plaquetario observado en pacientes urémicos no es debida a una exposición anormal de las glicoproteínas con función de receptor en la superficie de la membrana de las plaquetas en reposo.

Palabras clave: **Trombopatía urémica. Glicoproteína Ib. Glicoproteína IIb-IIIa. Inmunolocalización ultraestructural.**

## STUDY OF PLATELET MEMBRANE GPIb AND GPIIb-IIIa IN UREMIC PATIENTS

### SUMMARY

We have studied the distribution and density of platelet membrane glycoproteins GPIb and GPIIb-IIIa in a group of five hemodialyzed patients with uremic thrombopathy by using monoclonal antibodies (MoAb) specific to these glycoproteins. Samples of platelet rich plasma were fixed with paraformaldehyde and GPIb and GPIIb-IIIa were measured on platelet surfaces by immunoelectron microscopy using a colloidal gold-labelled secondary antibody. The morphometric study showed that the number of gold particles on platelet membrane for GPIb in

Recibido: 28-V-1989.  
En versión definitiva: 20-IX-1989.  
Aceptado: 29-IX-1989.

Correspondencia: Dr. A. Cases Amenós.  
Servicio de Nefrología.  
Hospital Clínic i Provincial.  
C. Villarroel, 170.  
08036 Barcelona.

normal platelets was  $1.9 \pm 0.15$  gold particles/ $\mu\text{m}$  and  $3.3 \pm 0.44$  gold particles/ $\mu\text{m}$  for GPIIb-IIIa. In uremic patients the density was of  $1.86 \pm 0.08$  gold particles/ $\mu\text{m}$  and  $2.95 \pm 0.33$  gold particles/ $\mu\text{m}$ , respectively, the differences between both groups did not reach statistical significance. These results suggest that the impairment of platelet function observed in uremic patients is not due to an abnormal exposure of GPIb or GPIIb-IIIa on resting platelet membrane in these patients.

Key words: **Uremic thrombopathy. Glucoprotein Ib. Glucoprotein IIb-IIIa. Ultrastructural immunolocalization.**

## Introducción

La diátesis hemorrágica presente en la uremia es debida a un trastorno del funcionalismo plaquetario<sup>1</sup>. Así, se ha observado que el tiempo de sangría está aumentado en estos pacientes<sup>2</sup> y que la adhesividad plaquetaria a las superficies extrañas está disminuida<sup>3</sup>. Asimismo las plaquetas urémicas presentan una disminución de la agregación plaquetaria *in vitro* inducida por el AP, epinefrina o colágeno<sup>4</sup>, así como una alteración de la adhesión plaquetaria sobre el subendotelio vascular en experimentos de perfusión *in vitro*<sup>5</sup>. Sin embargo, la patogenia de esta trombopatía no está totalmente dilucidada.

Las alteraciones anteriormente descritas podrían reflejar anomalías en las glicoproteínas de membrana con función de receptor. Sin embargo, no se han descrito hasta la fecha déficit o alteraciones moleculares de estas glicoproteínas en la uremia por métodos electroforéticos.

El objetivo de este trabajo ha sido estudiar a nivel ultraestructural la densidad y la distribución a nivel de la superficie de membrana de la glicoproteína Ib (GPIb) y glicoproteína IIb-IIIa (PIIb-IIIa) en plaquetas no estimuladas en un grupo de pacientes urémicos.

## Pacientes y métodos

### A) Pacientes

Se estudiaron cinco pacientes con insuficiencia renal crónica en programa de hemodiálisis, tres varones y dos mujeres, con una edad media de  $52 \pm 17$  años. Todos los pacientes presentaban una historia clínica previa de diátesis hemorrágica, así como una alteración del funcionalismo plaquetario definida por un tiempo de sangría prolongado (superior a quince minutos), una agregación plaquetaria inducida por el ADP disminuida y una alteración de la adhesión plaquetaria al subendotelio vascular. El recuento plaquetario y los test de coagulación (tiempo de protrombina, tiempo parcial de tromboplastina y fibrinógeno) eran normales en todos los pacientes. Ningún paciente había recibido aspirina u otros fármacos que alteren el funcionalismo plaquetario en las dos sema-

nas previas al estudio. La extracción de muestras de sangre se realizó inmediatamente antes de la sesión de hemodiálisis. Los estudios de glicoproteínas plaquetarias realizados mediante electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida fueron normales. Los resultados se compararon con los obtenidos en cinco sujetos controles normales.

### Immunolocalización ultraestructural de las glicoproteínas

#### B) Métodos

El plasma rico en plaquetas (PRP) se obtuvo por centrifugación de la sangre previamente anticoagulada con citrato trisódico (3,8 %) durante quince minutos a  $110 \times g$  y a  $20^\circ\text{C}$ . Las plaquetas fueron fijadas inicialmente mediante la adición de paraformaldehído 0,3 % en PBS al PRP durante quince minutos. Después las plaquetas fueron lavadas por centrifugación ( $800 \times g$  durante veinte minutos) y resuspen-



Fig. 1.—Microfotografías electrónicas de plaquetas marcadas con oro coloidal, a) Immunolocalización de la GPIIb-IIIa en plaquetas normales en reposo. b) Immunolocalización de la GPIIb-IIIa en plaquetas urémicas en reposo ( $\times 60.000$ ).

sión en PBS en tres ocasiones. Finalmente, el pellet fue resuspendido en PBS y fijado durante una hora en paraformaldehído al 1 % en PBS. Tras esta fijación las plaquetas fueron nuevamente lavadas en PBS y resuspendidas en este buffer a una concentración de  $8 \times 10^5$  plaquetas/ $\mu\text{l}$ .

Alícuotas de 200  $\mu\text{l}$  de plaquetas fijadas fueron incubadas durante treinta minutos con 10  $\mu\text{l}$  de 6D1 (anticuerpo monoclonal antiGPIb)<sup>6</sup> o de EDU-3 (anticuerpo monoclonal anti-GPIIb-IIIa)<sup>7</sup>. Posteriormente fueron lavadas tres veces por centrifugación y resuspensión en PBS. Estas plaquetas fueron incubadas con 25  $\mu\text{l}$  de una solución 1:8 (v:v) de anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón marcado con oro coloidal (Janssen Pharmaceutica, Olen, Bélgica) en 0,02 M de buffer Tris. Las plaquetas marcadas fueron lavadas tres veces en PBS, fijadas en glutaraldehído 2 % y cacodilato 0,1 M; posfijadas en ácido ósmico al 2 % y procesadas para microscopia electrónica. La observación de los cortes ultrafinos se realizó en un microscopio electrónico Philips modelo EM 201..

#### Cuantificación morfométrica del marcaje con oro coloidal

Se estudiaron fotografías obtenidas al azar de las diversas secciones de las plaquetas marcadas. El número de partículas de oro ligadas a la membrana se determinó sobre fotografías realizadas a 60.000 aumentos. El perímetro de la membrana se obtuvo trazando los contornos plaquetarios sobre una tabla digitalizadora de un analizador morfométrico semiautomatizado (MOP 20, Kontron, Zürich, Suiza).

Los resultados se expresaron como media  $\pm$  e.e.m. Para el análisis estadístico se utilizó el test de la t de Student para datos no apareados. Se consideraron como significativos valores de  $p < 0,05$ .

#### Resultados

Como puede observarse en la tabla 1, el número de partículas de oro asociadas a la superficie externa de la membrana de las plaquetas en reposo de sujetos normales era de  $1,9 \pm 0,15$  partículas/ $\mu\text{m}$  tras la incubación con el anticuerpo monoclonal anti-GPIb y de  $3,3 \pm 0,44$  partículas/ $\mu\text{m}$  tras incubación con el anticuerpo monoclonal anti-GPIIb-IIIa. La distribución de estas dos glicoproteínas en la superficie plaquetaria era uniforme.

En las plaquetas urémicas en reposo la densidad de partículas de oro para el anticuerpo monoclonal anti-GPIb era similar al observado en plaquetas normales ( $1,86 \pm 0,08$  partículas/ $\mu\text{m}$ ,  $p = \text{NS}$ ). Asimismo se obtuvieron resultados similares a los observados en plaquetas normales en las plaquetas urémicas incubadas con el anticuerpo monoclonal anti-GPIIb-IIIa

**Tabla 1.** Densidad de glicoproteínas de membrana en plaquetas normales y urémicas obtenidas por inmunolocalización ultraestructural

Plaquetas	Normales	Urémicas
Glicoproteína Ib (partículas oro/ $\mu\text{m}$ ) .....	$1,9 \pm 0,15$	$1,86 \pm 0,08$
Glicoproteína IIb-IIIa (partículas oro/ $\mu\text{m}$ ) .....	$3,3 \pm 0,44$	$2,95 \pm 0,33$

Media  $\pm$  e.s.m.

( $2,95 \pm 0,33$  partículas/ $\mu\text{m}$ ,  $p = \text{NS}$ ). Asimismo, la distribución de ambas glicoproteínas en la superficie de la membrana plaquetaria era uniforme.

#### Discusión

La patogenia de la trombopatía urémica no está totalmente esclarecida. Dado que la alteración de la adhesión y agregación de las plaquetas urémicas no puede ser atribuida a anomalías cuantitativas o cualitativas de las proteínas plasmáticas adhesivas (factor von Willebrand, fibrinógeno o fibronectina), otra hipótesis a considerar sería que esta trombopatía pudiera ser debida a una alteración de la densidad o la distribución de las glicoproteínas de membrana con función de receptor. Sin embargo, nuestros resultados sugieren que la densidad y la distribución en la superficie de la membrana de las plaquetas en reposo de las glicoproteínas con función de receptor es normal en la uremia.

La glicoproteína Ib es el receptor principal del factor von Willebrand (FvW) y media en la adhesión plaquetaria al subendotelio vascular<sup>8</sup>. Es conocido que en la uremia la adhesión plaquetaria a superficies extrañas<sup>3</sup> o al subendotelio vascular<sup>5</sup> están disminuidas. Por otra parte, la mayoría de autores coinciden en señalar que no existen alteraciones de las actividades plasmáticas asociadas al complejo factor VIII-FvW<sup>1</sup>, así como tampoco en la estructura multimérica del FvW<sup>9</sup>. Nuestros resultados sugieren que la disminución de la adhesividad plaquetaria en la uremia no es debida tampoco a una alteración de la densidad o distribución de la GPIb en la superficie de la membrana plaquetaria. Recientemente se ha descrito que la unión de factor von Willebrand a las plaquetas urémicas inducido por ristocetina es normal en la uremia<sup>10</sup>, lo que apoyaría nuestros resultados.

La glicoproteína IIb-IIIa, tras la estimulación de la plaqueta por diversos agonistas, sufre un cambio conformacional y se convierte en el receptor para el fibrinógeno y otras proteínas adhesivas e interviene en la agregación plaquetaria<sup>11, 12</sup>. Di Minno y cols.<sup>13</sup> han descrito que la unión del fibrinógeno a

plaquetas urémicas, inducida por un agonista, está alterada. De acuerdo con nuestros resultados, la alteración del funcionalismo plaquetario en la uremia no es debido a una exposición anormal de la GPIIb-IIIa en las plaquetas en reposo. Sin embargo, no se puede descartar que la disminución de la agregación plaquetaria *in vitro* que presentan las plaquetas urémicas se deba a una alteración en los cambios conformacionales de esta glicoproteína cuando la plaqueta es estimulada. El estudio de la exposición de los receptores para el fibrinógeno tras la activación plaquetaria no puede ser llevado a cabo con la técnica utilizada en este trabajo, ya que la activación de las plaquetas en el PRP desencadena la interacción de los ligandos (fibrinógeno, factor von Willebrand y fibronectina) con la GPIIb-IIIa activada y la subsiguiente agregación plaquetaria. La unión de estos ligandos con el receptor y la inaccesibilidad de determinadas zonas de la membrana que interconectan con otras plaquetas en la agregación imposibilitan la localización por el anticuerpo monoclonal de los epítopes de la GPIIb-IIIa. Las técnicas que utilizan ligandos marcados radiactivamente para la determinación de receptores<sup>10, 13</sup> precisan de la presencia de un agonista para inducir la unión del ligando con el receptor, por lo que permiten valorar la exposición de receptores en la plaqueta activada. Sin embargo, y a diferencia de la técnica utilizada en este estudio, no son útiles para la evaluación del número de epítopes en las plaquetas en reposo.

En conclusión, nuestros resultados sugieren que la alteración del funcionalismo plaquetario presente en la uremia no es debida a una exposición anormal de las glicoproteínas de la membrana plaquetaria con función de receptor en la plaqueta en reposo.

## Bibliografía

1. Deykin D: Uremic bleeding. *Kidney Int* 24:698-705, 1983.
2. Steiner RW, Coggins C y Carvalho ACA: Bleeding time in uremia. *Am J Haematol* 7:107-117, 1979.
3. Salzman EW y Neri U: Adhesiveness of blood platelets in uremia. *Thromb Diath Haemorrh* 15:84-92, 1966.
4. Di Minno G, Martínez J, McKean ML, De la Rosa J, Burke JF y Murphy S: Platelet dysfunction in uremia. Multifaceted defect partially corrected by dialysis. *Am J Med* 79:552-559, 1985.
5. Castillo R, Lozano T, Escolar G, Revert L, López J y Ordinas A: Defective platelet adhesion on vessel subendothelium in uremic patients. *Blood* 68:337-342, 1986.
6. Coller BS, Peerschke EI, Scudder LE y Sullivan CA: Studies with a murine monoclonal antibody that abolishes ristocetin-induced binding of von Willebrand factor to platelets: Additional evidence in support of GPIb as a platelet receptor for von Willebrand factor. *Blood* 61:99-101, 1983.
7. Vilella R, Lozano T, Mila J, Borche L, Ercilla G, Ordinas A y Vives J: An antiplatelet monoclonal antibody that inhibits ADP and epinephrine-induced aggregation. *Thromb Haemost* 51:93-96, 1984.
8. George JN, Nurden AT y Phillips DR: Molecular defects in interactions of platelets with the vessel wall. *N Engl J Med* 311:1084-1087, 1984.
9. Mannucci PM, Remuzzi G, Pusineri F, Lombardi R, Valsecchi C, Mecca G y Zimmerman TS: Deamino-8-D-arginine vasopressin shortens the bleeding time in uremia. *N Engl J Med* 308:8-12, 1983.
10. Gralnick HR, McKeown LP, Williams SB y Shafer B: Plasma and platelet von Willebrand factor defects in uremia. *Am J Med* 85:806-810, 1989.
11. Marguerie GA, Plow EF y Edgington TS: Human platelets possess an inducible and saturable receptor specific for fibrinogen. *J Biol Chem* 254:5357-5363, 1979.
12. Carrell NA, Fitzgerald LA, Steiner B, Erikson HD y Phillips DR: Structure of human platelet membrane glycoproteins IIb and IIIa as determined by electron microscopy. *J Biol Chem* 260:1743-1749, 1985.
13. Di Minno G, Cerbone A, Usberti M, Cianciaruso B, Cortese A, Farace MJ, Martínez J y Murphy S: Platelet dysfunction in uremia II. Correction by arachidonic acid of the impaired exposure of fibrinogen receptors by adenosine diphosphate or collagen. *J Lab Clin Med* 108:246-252, 1986.